

(11)Publication number : 09-255572
(43)Date of publication of application : 30.09.1997

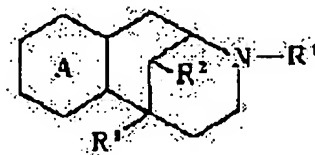
// C07D221/26

(71)Applicant : TAKEDA CHEM IND LTD

(72)Inventor : HONDA SUSUMU
FUJISAWA TOMOYUKI
OOHAYASHI HARUMI

(57)Abstract:

SOLUTION: This chemokine receptor-antagonizing medicine contains a compound of the formula (the ring A is a benzene ring which may be substituted); R1 is a hydrocarbon group which may be substituted; R3 and R4 are each a 1-6C hydrocarbon group which may be substituted) or its salt. This medicine has an excellent chemokine receptor-antagonizing action, and has excellent effects on the therapy and prevention of viral diseases, infectious diseases, tumors, allergic diseases, inflammatory diseases, diabetic diseases, central diseases, hyperlipemia, hypercholesterolemia, thrombocytopenia caused by dialysis, spinal cord injuries, bone osteoporosis, ulcerative colitis, digestive ulcer, septicemia (shock), reperfusion disorders, unstable angina pectoris, transient ischemic attack, valvular heart disease, rejection symptoms after organ transplantation,



THIS PAGE BLANK (USPTO)

restenosis after angioplasty, systemic erythematodes, multiple sclerosis, renal failure, endometritis, pulmonary fibrosis, adult respiratory distress syndromes, etc.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-255572

(43) 公開日 平成9年(1997)9月30日

| (51) Int. Cl. | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|---------------|------|--------|-------------|--------|
| A61K 31/435 | AED | | A61K 31/435 | AED |
| | AAB | | | AAB |
| | AAM | | | AAM |
| | AAQ | | | AAQ |
| | AAR | | | AAR |

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全12頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-69500

(22) 出願日 平成8年(1996)3月26日

(71) 出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72) 発明者 本多 進

兵庫県西宮市泉町6番22号

(72) 発明者 藤澤 朋行

茨城県つくば市梅園2丁目5番地3 梅園
スクエアB-206

(72) 発明者 大林 ハル実

茨城県つくば市千現2丁目11番地16 エミ
ネンス洞峰603号

(74) 代理人 弁理士 朝日奈 忠夫 (外1名)

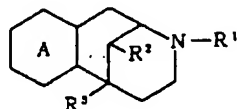
(54) 【発明の名称】 ケモカイン受容体拮抗剤

(57) 【要約】

【課題】 優れたケモカイン受容体拮抗剤の提供。

【解決手段】 一般式

【化1】



【式中、A環は置換されていてもよいベンゼン環を、R²は置換されていてもよい炭化水素基を、R³およびR¹は置換されていてもよいC₁₋₄炭化水素基を示す】で表わされる化合物またはその塩を含有してなるケモカイン受容体拮抗剤。

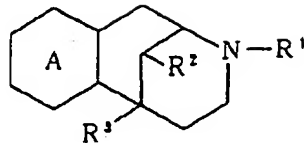
【効果】 優れたケモカイン受容体拮抗作用を有しており、例えば、ウイルス性疾患あるいは感染性疾患、腫瘍、アレルギー性疾患、炎症性疾患、糖尿病性疾患、中枢性疾患、高脂血症、高コレステロール血症、透析による血小板減少症、脊髄損傷、骨粗鬆症、潰瘍性大腸炎、消化性潰瘍、敗血症（ショック）、肺・心臓における再灌流障害、不安定狭心症、一過性脳虚血発作、心弁膜

症、臓器移植後拒絶反応、血管形成術後再狭窄、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、腎不全、子宮内膜症、肺繊維症、成人呼吸逼迫症候群などに対する優れた治療・予防効果を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式

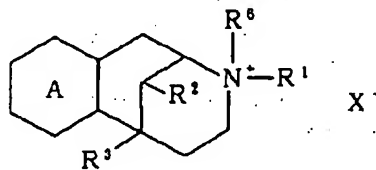
【化1】



【式中、A環は置換されていてもよいベンゼン環を、R¹は置換されていてもよい炭化水素基を、R²およびR³はそれぞれ置換されていてもよいC₁-₄炭化水素基を示す】で表わされる化合物またはその塩を含有してなるケモカイン受容体拮抗剤。

【請求項2】 塩が、一般式

【化2】



【式中、R⁴は水素原子または置換されていてもよい炭化水素基を、X⁻はアニオン原子を、他の記号は請求項1と同意義を示す】で表わされる化合物である請求項1記載のケモカイン受容体拮抗剤。

【請求項3】 A環が水酸基で置換されたベンゼン環である請求項1記載の拮抗剤。

【請求項4】 R¹で示される炭化水素基がC₁-₄炭化水素基である請求項1記載の拮抗剤。

【請求項5】 R¹で示される炭化水素基がC₁-₄アルケニル基またはC₁-₄アラルキル基である請求項1記載の拮抗剤。

【請求項6】 R²およびR³がメチル基である請求項1記載の化合物。

【請求項7】 R²で示される炭化水素基がC₁-₄炭化水素基である請求項2記載の拮抗剤。

【請求項8】 R²で示される炭化水素基がC₁-₄アルケニル基またはC₁-₄アラルキル基である請求項2記載の拮抗剤。

【請求項9】 X⁻がハロゲンイオンである請求項2記載の拮抗剤。

【請求項10】 ケモカインがCCケモカインである請求項1記載の拮抗剤。

【請求項11】 CCケモカインがRANTES、MIP-1αまたはMCP-3である請求項10記載の拮抗剤。

【請求項12】 ケモカイン受容体拮抗剤が、アレルギー性疾患、動脈硬化症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、多発性硬化症、慢性関節リウマチまたは炎症性疾患の治療・予防剤である請求項1記載の拮抗剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ベンズアゾシン化合物等を含有してなるケモカイン受容体拮抗剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 ケモカイン (chemokine, chemotactic cytokineの略) は、白血球に対する遊走活性を有する一群のタンパク質である (クリティカル・レビュー・イン・イムノロジー (Critical Reviews in Immunology) 12:17-46 (1992); カレント・オピニオン・イン・イムノロジー (Current Opinion in Immunology) 6:865-873 (1994))。近年、ケモカインが炎症の急性期および慢性期においてその病態の発症、進展、および増悪に関与していることが明らかにされつつある。ケモカインはいずれも4個のシステインをもち、1番目と2番目のシステインの間に1個のアミノ酸が挿入されたCXCケモカインサブファミリー (αケモカインサブファミリー) と1番目と2番目のシステインが隣接したCCケモカインサブファミリー (βケモカインサブファミリー) に分かれる。CCケモカインサブファミリーには、RANTES (regulated on activation, normal T expressed and secreted)、MIP-1α (macrophage inflammatory protein 1α)、MIP-1β、MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1)、MCP-2、MCP-3、I-309などがある。CCケモカインは、単球、リンパ球、好酸球、好塩基球、肥満細胞に作用してこれらの細胞を遊走させ、また脱顆粒や種々の炎症性メディエーターの放出などの作用をもつ。CCケモカインのうち、MIP-1αおよびRANTESに高い親和性を示すヒトMIP-1α/RANTES受容体 (CCR-1と略称する場合もある) の構造は、1993年に明らかになった (セル (Cell) 72:415-425 (1993); ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (J. Exp. Med.) 177:1421-1427 (1993))。その後、MIP-1α/RANTES受容体はMCP-3に対する受容体でもあることが報告された (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 270:16491-16494 (1995))。

【0003】 一方、慢性関節リウマチ患者滑膜組織で、RANTESおよびMIP-1α/RANTES受容体のmRNAの発現量が亢進していることが観察され (ランセット (Lancet) 343:547-548 (1994))、また心臓移植後の心血管の内膜肥厚部位でRANTESのmRNAの発現量が亢進したので (サーキュレーション (Circulation) 82:1111-699 (1990))、該疾患にRANTESが関与することが示唆される。さらに、腎移植拒絶時に移植部位でRANTES mRNAの発現およびRANTESタンパク量が増加したので (ランセット (Lancet) 343:209-211 (1994))、臓器移植拒絶にRANTESが

関与すると考えられる。また、リウマチ患者滑液中にMIP-1 α タンパクが増加することが報告され(ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.) 93:921-928(1994))、マウスコラーゲン関節炎実験において抗MIP-1 α 抗体の投与が、関節炎の発症を遅らせさらに症状を寛和させた(ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.) 95:2868-2876(1995))。さらに、抗MIP-1 α 抗体の投与はマウス実験的自己免疫性脳脊髄炎(マウス実験的アレルギー性脳脊髄炎)にも有効であった(ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.) 155:5003-5010(1995))。したがって、MIP-1 α も慢性関節リウマチの発症に関与し、また多発性硬化症にも関与すると推察される。好酸球、好塩基球および肥満細胞は、炎症部位への集積、活性化によって、アレルギー性疾患の発症、進展、および増悪に関わる。RANTESは、好酸球の遊走因子でもあり(ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.) 176:587(1992); ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.) 176:1489(1992))、ヒトにRANTESを皮内注射すると単核球と好酸球の浸潤がみられた(ファセブジャーナル(FASEB J.) 9:A804(1995))。

【0004】

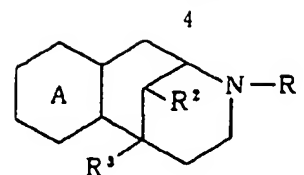
【発明が解決しようとする課題】以上のことから、これらのCCケモカインの作用を阻害する拮抗剤は、慢性関節リウマチ、動脈硬化、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、多発性硬化症、腎炎などの治療・予防剤として用いることができる。しがしながら、現在CCケモカインの作用を阻害する拮抗剤の報告はない。また、いくつかのベンズアゾシン化合物が鎮痛作用を有することが知られている(ジャーナル・オブ・ヘテロサイクリック・ケミストリー(J. Heterocycl. Chem.) 9:1057-1059(1972)、ジャーナル・オブ・ヘテロサイクリック・ケミストリー(J. Heterocycl. Chem.) 9:1065-1069(1972))が、これらの化合物がCCケモカイン受容体拮抗作用を示すことは全く報告されていない。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題に鑑み、MIP-1 α 、RANTES、MCP-3などのCCケモカインによって惹起される疾患を阻害する新規な薬剤を開発するために、種々の化合物を用いて研究を重ねた結果、公知のベンズアゾシン化合物にCCケモカイン受容体拮抗作用を見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち、本発明は(1)一般式

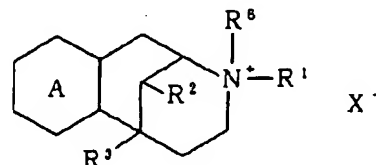
【化3】



【式中、A環は置換されていてもよいベンゼン環を、R¹は置換されていてもよい炭化水素基を、R¹およびR²はそれぞれ置換されていてもよいC₁₋₁₀炭化水素基を示す】で表わされる化合物またはその塩を含有してなるケモカイン受容体拮抗剤、

【0007】(2)塩が、一般式

【化4】



【式中、R¹は水素原子または置換されていてもよい炭化水素基を、X⁻はアニオン原子を、他の記号は第

(1)項と同意義を示す】で表わされる化合物である第(1)項記載のケモカイン受容体拮抗剤、

【0008】(3)A環が水酸基で置換されたベンゼン環である第(1)項記載の拮抗剤、(4)R¹で示される炭化水素基がC₁₋₁₀炭化水素基である第(1)項記載の拮抗剤、(5)R¹で示される炭化水素基がC₁₋₁₀アルケニル基またはC₇₋₁₀アラルキル基である第(1)項記載の拮抗剤、(6)R¹およびR²がメチル基である第

(1)項記載の化合物、(7)R⁶で示される炭化水素基がC₁₋₁₀炭化水素基である第(2)項記載の拮抗剤、

(8)R⁶で示される炭化水素基がC₁₋₁₀アルケニル基またはC₇₋₁₀アラルキル基である第(2)項記載の拮抗剤、(9)X⁻がハロゲンイオンである第(2)項記載の拮抗剤、(10)ケモカインがCCケモカインである第(1)項記載の拮抗剤、(11)CCケモカインがRANTES、MIP-1 α またはMCP-3である第

(10)項記載の拮抗剤、および(12)ケモカイン受容体拮抗剤が、アレルギー性疾患、動脈硬化症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、多発性硬化症、慢性関節リウマチまたは炎症性疾患の治療・予防剤である第(1)項記載の拮抗剤を提供する。

【0009】上記の式【1】において、A環で示されるベンゼン環が有していてもよい置換基としては、例えば、置換されていてもよい水酸基、ハロゲン原子などで置換されていてもよいC₁₋₁₀アルキル(例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、s-ブチル、t-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル等が挙げられ、このうちC₁₋₁₀アルキルが好ましい)、C₁₋₁₀シク

ロアルキル(例、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル等)、 C_{1-10} アルケニル(例、ビニル、アリル、2-メチルアリル、2-ブテニル、3-ブテニル、3-オクテニル等、このうち C_{1-4} アルケニルが好ましい)、 C_{1-10} アルキニル(例、エチニル、2-プロピニル、3-ヘキシニル等、このうち C_{1-4} アルキニルが好ましい)、 C_{1-10} シクロアルケル(例、シクロプロペニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル等、このうち C_{1-7} シクロアルケルが好ましい)、 C_{1-10} アリール(例、フェニル、ナフチル等)、 C_{1-10} アラルキル(例、ベンジル、フェニルエチル、トリチル等)、ニトロ、メルカプト、オキソ、チオキソ、シアノ、カルバモイル、カルボキシル、 C_{1-10} アルコキシカルボニル(例、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル等)、スルホ、ハロゲン原子(フッ素、塩素、臭素、ヨウ素)、

【0010】 C_{1-10} アルキルチオ(例、メチルチオ、エチルチオ、 n -プロピルチオ、イソプロピルチオ、 n -ブチルチオ、 t -ブチルチオ等)、 C_{1-10} アリールチオ(例、フェニルチオ等)、 C_{1-10} アルキルスルフィニル(例、メチルスルフィニル、エチルスルフィニル等)、 C_{1-10} アリールスルフィニル(例、フェニルスルフィニル等)、 C_{1-10} アルキルスルホニル(例、メチルスルホニル、エチルスルホニル等)、 C_{1-10} アリールスルホニル(例、フェニルスルホニル等)、アミノ、 C_{1-10} アシルアミノ(例、アセチルアミノ、プロピオニルアミノ等)、モノ-またはジ- C_{1-10} アルキルアミノ(例、メチルアミノ、エチルアミノ、 n -プロピルアミノ、イソプロピルアミノ、 n -ブチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ等)、 C_{1-10} シクロアルキルアミノ

(例、シクロプロピルアミノ、シクロブチルアミノ、シクロペンチルアミノ、シクロヘキシルアミノ等)、 C_{1-10} アリールアミノ(例、アニリノ等)、 C_{1-10} アルキルカルボニル(例、ホルミル、アセチル、ヘキサノイル等)、 C_{1-10} アリールカルボニル(例、ベンゾイル等)、炭素原子以外に酸素、硫黄、窒素等から選ばれたヘテロ原子を1ないし4個含む5ないし6員複素環基(例、2-または3-チエニル、2-または3-フリル、3-, 4-または5-ピラゾリル、2-, 4-または5-チアゾリル、3-, 4-または5-イソチアゾリル、2-, 4-または5-オキサゾリル、3-, 4-または5-イソオキサゾリル、2-, 4-または5-イミダゾリル、1, 2, 3-または1, 2, 4-トリアゾリル、1Hまたは2H-テトラゾリル、2-, 3-または4-ピリジル、2-, 4-または5-ピリミジル、3-または4-ピリダニジル、キノリル、イソキノリル、インドリル等)もしくはその縮合環基などが用いられる。なかでも、置換されていてよい水酸基などが好ましい。置換の数は1ないし4個、好ましくは1ないし2個である。

【0011】上記のA環で示されるベンゼン環の置換基として用いられる「置換されていてよい水酸基」としては、例えば、

式 $-OR'$

【式中、 R' は水素原子、置換されていてよい炭化水素基または置換されていてよいアシル基を示す】で表わされる基などが用いられる。 R' で示される置換されていてよい炭化水素基の炭化水素基としては、例えば、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基などが用いられ、なかでも C_{1-10} 炭化水素基などが好ましく、特に C_{1-10} 炭化水素基などが好ましい。アルキル基としては、例えば、 C_{1-10} アルキル基(例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、 sec -ブチル、 $tert$ -ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル等)などが用いられ、なかでも、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、 t -ブチル、ペンチル、ヘキシル等の C_{1-6} アルキル基などが好ましい。アルケニル基としては、例えば、 C_{1-10} アルケニル基(例、ビニル、アリル、2-メチルアリル、2-ブテニル、3-ブテニル、3-オクテニル等)などが用いられ、なかでも、ビニル、ブタジエニル、ヘキサトリエニル等の C_{1-6} アルケニル基などが好ましい。アルキニル基としては、例えば、 C_{1-10} アルキニル基(例、エチニル、2-プロピニル、イソプロピニル、ブチニル、 t -ブチニル、3-ヘキシニル等)などが用いられ、なかでも C_{1-4} アルキニル基などが好ましい。シクロアルキルとしては、例えば、シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシル等の C_{1-7} シクロアルキル基などが好ましい。アリール基としては、例えば、フェニル、ナフチル、アントラセニル等の C_{1-10} アリール基などが用いられる。アラルキルとしては、例えば、ベンジル、フェニルエチル、ベンツヒドリール、トリチル等の C_{1-10} アラルキル基などが用いられ、なかでも C_{1-10} アラルキルなどが好ましい。これら炭化水素基の中でも、 C_{1-10} アルキル基が好ましい。

【0012】 R' で示される置換されていてよいアシル基のアシル基としては、例えば、式 $-CO-R'$ (式中、 R' は置換されていてよい炭化水素基または置換されていてよい炭化水素オキシ基を示す)で表わされる基などが用いられ、 C_{1-10} 脂肪族カルボン酸から誘導されるアシル基(C_{1-10} アシル基)などが好ましい。上記炭化水素基および炭化水素オキシ基における炭化水素基としては、上記の R' で示されるアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基などの炭化水素基と同様のものが用いられる。アシル基としては、具体的には、例えば、 C_{1-10} アシル基が好ましく、例えば、① C_{1-10} アルキルカ

ルボニル基(例、ホルミル、アセチル、プロピオニル、イソプロピオニル、ブチリル、イソブチリル、バレリル、イソバレリル、ヒバロイル、ヘキサノイル等)、② C_{1-4} アルケニルカルボニル基(例、アクリロイル、メタクリロイル、クロトノイル、イソクロトノイル等)、③ C_{3-7} シクロアルキルカルボニル基(例、シクロプロパンカルボニル、シクロブタンカルボニル、シクロペンタンカルボニル、シクロヘキサンカルボニル等)、④ C_{1-11} アリールカルボニル基(例、ベンゾイル、ナフトイル等)、⑤ C_{7-11} アラルキルカルボニル基(例、フェニルアセチル、フェニルプロピオニル、フェニルブチリル等)、⑥ C_{1-11} アリール- C_{1-4} アルケニルカルボニル基(例、シンナモイル、アトロポイル等)、⑦ C_{1-4} アルコキシカルボニル基(例、アセトキシ、エトキシカルボニル等)、⑧ C_{1-11} アリールオキシカルボニル基(例、ベンズオキシカルボニル等)、⑨ C_{7-11} アラルキルオキシカルボニル基(例、ベンジルオキシカルボニル等)などが用いられる。なかでも、炭素数 C_{1-4} アルキルカルボニル基、 C_{1-4} アルコキシカルボニル基などが好ましい。

【0013】上記の R' または R'' で示される炭化水素基、および R' で示される炭化水素基オキシ基の炭化水素基は、次の置換基を有していてもよい。

(i) 炭化水素基の中でもシクロアルキル基、アリール基ならびにアラルキル基の置換基としては、例えば、ハロゲン原子で置換されていてもよい C_{1-11} アルキル

(例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*s*-ブチル、*t*-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル等が挙げられ、このうち C_{1-4} アルキルが好ましい)、 C_{3-7} シクロアルキル(例、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル等)、 C_{1-11} アルケニル(例、ビニル、アリル、2-メチルアリル、2-ブテニル、3-ブテニル、3-オクテニル等、このうち C_{1-4} アルケニルが好ましい)、 C_{1-10} アルキニル(例、エチニル、2-プロピニル、3-ヘキシニル等、このうち C_{1-4} アルキニルが好ましい)、 C_{3-10} シクロアルケル(例、シクロプロペニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル等、このうち C_{3-7} シクロアルキルが好ましい)、 C_{1-11} アリール(例、フェニル、ナフトイル等)、 C_{7-11} アラルキル(例、ベンジル、フェニルエチル、トリチル等)、ニトロ、ヒドロキシル、メルカプト、オキソ、チオキソ、シアノ、カルバモイル、カルボキシル、 C_{1-4} アルコキシカルボニル(例、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル等)、スルホ、ハロゲン原子(フッ素、塩素、臭素、ヨウ素)、 C_{1-4} アルコキシ(例、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、*s*-ブトキシ、*t*-ブトキシ等)、 C_{1-11} アリールオキシ(例、フェノキ

シ等)、

【0014】 C_{1-4} アルキルチオ(例、メチルチオ、エチルチオ、*n*-プロピルチオ、イソプロピルチオ、*n*-ブチルチオ、*t*-ブチルチオ等)、 C_{1-11} アリールチオ(例、フェニルチオ等)、 C_{1-11} アルキルスルフィニル(例、メチルスルフィニル、エチルスルフィニル等)、 C_{1-11} アリールスルフィニル(例、フェニルスルフィニル等)、 C_{1-11} アルキルスルホニル(例、メチルスルホニル、エチルスルホニル等)、 C_{1-11} アリールスルホニル(例、フェニルスルホニル等)、アミノ、 C_{1-4} アシルアミノ(例、アセチルアミノ、プロピオニルアミノ等)、モノ-またはジ- C_{1-4} アルキルアミノ(例、メチルアミノ、エチルアミノ、*n*-プロピルアミノ、イソプロピルアミノ、*n*-ブチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ等)、 C_{3-7} シクロアルキルアミノ

(例、シクロプロピルアミノ、シクロブチルアミノ、シクロペンチルアミノ、シクロヘキシルアミノ等)、 C_{1-11} アリールアミノ(例、アニリン等)、 C_{1-4} アルキルカルボニル(例、ホルミル、アセチル、ヘキサノイル

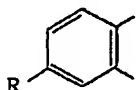
等)、 C_{1-4} アルキルカルボニルオキシ(例、アセトキシ、プロピオニルオキシ等)、 C_{1-11} アリールカルボニル(例、ベンゾイル等)、炭素原子以外に酸素、硫黄、窒素等から選ばれたヘテロ原子を1ないし4個含む5ないし6員複素環基(例、2-または3-チエニル、2-または3-フリル、3-, 4-または5-ピラゾリル、2-, 4-または5-チアゾリル、3-, 4-または5-イソチアゾリル、2-, 4-または5-オキサゾリル、3-, 4-または5-イソオキサゾリル、2-, 4-または5-イミダゾリル、1, 2, 3-または1, 2, 4-トリアゾリル、1Hまたは2H-テトラゾリル、2-, 3-または4-ピリジル、2-, 4-または5-ピリミジル、3-または4-ピリダニル、キノリル、イソキノリル、インドリル等)もしくはその縮合環基などが用いられる。置換の数は1ないし6個、好ましくは1ないし3個、さらに好ましくは1ないし2個である。

【0015】(ii) 炭化水素基の中でもアルキル基、アルケニル基およびアルキニル基の置換基としては、例えば、前記した C_{3-7} シクロアルキル、 C_{3-10} シクロアルケル、ニトロ、ヒドロキシル、メルカプト、オキソ、チオキソ、シアノ、カルバモイル、カルボキシル、 C_{1-4} アルコキシカルボニル、スルホ、ハロゲン原子、 C_{1-4} アルコキシ、 C_{1-11} アリールオキシ、 C_{1-4} アルキルチオ、 C_{1-11} アリールチオ、 C_{1-4} アルキルスルフィニル、 C_{1-11} アリールスルフィニル、 C_{1-4} アルキルスルホニル、 C_{1-11} アリールスルホニル、アミノ、 C_{1-4} アシルアミノ、モノ-またはジ- C_{1-4} アルキルアミノ、 C_{3-7} シクロアルキルアミノ、 C_{1-11} アリールアミノ、 C_{1-4} アルキルカルボニル、 C_{1-4} アルキルカルボニルオキシ、 C_{1-11} アリールカルボニル、炭素原子以外に酸

素、硫黄、窒素等から選ばれたヘテロ原子を1ないし4個含む5ないし6員複素環基もしくはその縮合環基などが用いられる。置換の数は1ないし6個、好ましくは1ないし3個、さらに好ましくは1ないし2個である。

【0016】A環としては、式

【化5】



【式中、Rは置換されていてもよい水酸基を示す】で表わされる環が好ましい。Rで示される置換されていてもよい水酸基としては、前記のA環で示されるベンゼン環の置換基として例示した置換されていてもよい水酸基（例えば、式-O R'で表わされる基など）と同様のものが用いられる。

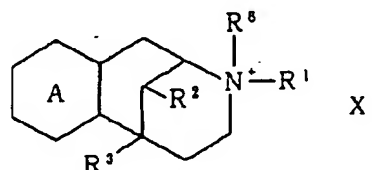
【0017】R'で示される置換されていてもよい炭化水素基としては、前記のR'で示される置換されていてもよい炭化水素基と同様のものが用いられる。具体的には、R'で示される炭化水素基としては、C₁₋₁₀炭化水素基が好ましく、例えば、C₁₋₁₀アルキル基、C₁₋₁₀アルケニル基、C₇₋₁₀アラルキル基が好ましく、特にC₂₋₁₀アルケニル基、C₇₋₁₀アラルキル基が好適である。該炭化水素基の置換基としては、例えば、水酸基、C₁₋₁₀アルコキシカルボニルオキシ基、C₃₋₇シクロアルキル基などが好ましい。Rで示される置換された炭化水素基としては、例えば、C₃₋₇シクロアルキル基で置換されたC₁₋₁₀アルキル基や、水酸基またはC₁₋₁₀アルコキシカルボニルオキシ基で置換されたC₇₋₁₀アラルキル基が好ましい。

【0018】R²またはR³で示される置換されていてもよいC₁₋₁₀炭化水素基のC₁₋₁₀炭化水素基としては、例えば、C₁₋₁₀アルキル基、C₂₋₁₀アルケニル基、C₃₋₁₀アルキニル基などが用いられ、なかでもC₁₋₁₀アルキル基などが好ましく、特にC₁₋₁₀炭化水素基などが好ましい。C₁₋₁₀アルキル基としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどが用いられ、なかでも、メチル、エチル、プロピル、イソプロピルなどのC₁₋₃アルキル基が好ましく、特にメチル基が好適である。C₂₋₁₀アルケニル基としては、例えば、ビニル、アリル、2-メチルアリル、2-ブテニル、3-ブテニル、3-オクテニル等などが用いられる。C₃₋₁₀アルキニル基としては、例えば、エチニル、2-プロピニル、イソプロピニル、ブチニル、t-ブチニル、3-ヘキシニルなどが用いられる。これらC₁₋₁₀炭化水素基の置換基としては、例えば、ニトロ、ヒドロキシル、メルカプト、オキソ、チオキソ、シアノ、カルバモイル、カルボキシル、C₁₋₁₀アルコキシカルボニル、スルホ、ハロゲン原子、C₁₋₁₀アルコキシ、C₁₋₁₀アルキルカルボニルオキシ、C₁₋₁₀アルキルチオ、C₁₋₁₀ア

ルキルスルフィニル、C₁₋₁₀アルキルスルホニル、アミノ、C₁₋₁₀アシルアミノ、モノ-またはジ-C₁₋₁₀アルキルアミノ、C₁₋₁₀アルキルカルボニル、C₁₋₁₀アルキルカルボニルオキシなどが用いられる。置換の数は1ないし6個、好ましくは1ないし3個、さらに好ましくは1ないし2個である。

【0019】化合物【I】の塩としては、例えば、一般式

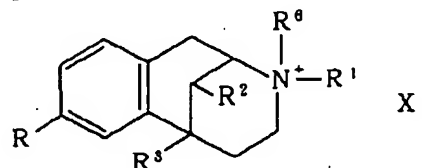
【化6】



【式中、R'は水素原子または置換されていてもよい炭化水素基を、X'はアニオン原子を、A環、R¹、R²およびR³は前記と同意義を示す】で表わされる酸付加塩が好ましく、特に、一般式

【0020】

【化7】



【式中、R、R¹、R²、R³、R'およびX'は前記と同意義を示す】で表わされる酸付加塩が好適である。

【0021】R'で示される置換されていてもよい炭化水素基としては、R'で示される置換されていてもよい炭化水素基と同様のものが用いられる。該炭化水素基としては、C₁₋₁₀炭化水素基などが好ましく、例えば、C₁₋₁₀アルキル基、C₂₋₁₀アルケニル基、C₇₋₁₀アラルキル基などが用いられる。なかでも、C₁₋₁₀アルケニル基、C₇₋₁₀アラルキル基が好適である。該炭化水素基の置換基としては、例えば、水酸基、C₁₋₁₀アルコキシカルボニルオキシ基、C₃₋₇シクロアルキル基などが好ましい。R²またはR³で示される置換された炭化水素基としては、例えば、C₃₋₇シクロアルキル基で置換されたC₁₋₁₀アルキル基や、水酸基またはC₁₋₁₀アルコキシカルボニルオキシ基で置換されたC₇₋₁₀アラルキル基が好ましい。より具体的には、R'およびR²としては、一方がC₂₋₁₀アルケニル基（例えば、-CH₂CH=CH(CH₃)CH₂など）で、他方が水酸基もしくはC₁₋₁₀アルコキシカルボニルオキシ基などで置換されていてもよいC₇₋₁₀アラルキル基（例えば、ベンジル基など）である場合が好ましい。X'で示されるアニオン原子としては、例えば、ハロゲンイオン（例えば、塩素イオン、臭素イオン、ヨウ素イオンなど）、硫酸イオン、硝酸イオ

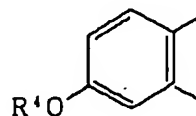
11

ン、リン酸イオン、ギ酸イオン、酢酸イオン、クエン酸イオン、フマル酸イオン、シュウ酸イオン、酒石酸イオン、マレイン酸イオン、コハク酸イオン、リンゴ酸イオンなどが用いられ、なかでも臭素イオンなどのハロゲンイオンが好適である。

【0022】化合物【1】の R^1 、 R^2 または R^3 に酸性基（例えば、カルボキシル基など）または塩基性基（例えば、アミノ基など）を有している場合、さらに塩として用いてもよく、好ましくは薬理的に許容される塩が用いられる。このような塩としては、化合物【1】が酸性基を有する場合、例えばアルカリ金属（例、ナトリウム、カリウム等）との塩、アルカリ土類金属（例、カルシウム、マグネシウム等）との塩などの塩基付加塩が挙げられる。化合物【1】が塩基性基を有する場合、例えば無機酸（例、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸、ギ酸、酢酸等）、有機酸（例、酢酸、プロピオン酸、クエン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸等）などの酸との塩などの酸付加塩が用いられる。

【0023】上記した化合物【1】の中でも、A環としては、式

【化8】

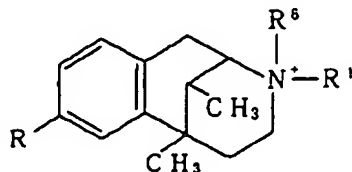


（式中、 R' は前記と同意義を示す）で表わされる基が好ましく、 R' としては、例えば、水素原子、 C_{1-10} アルキル基または C_{1-10} アルコキシカルボニル基などが好ましく、特に、水素原子が好適である。

【0024】 R^1 としては、① C_{1-10} シクロアルキル基で置換された C_{1-10} アルキル基、② C_{1-10} アルケニル基、③水酸基または C_{1-10} アルコキシカルボニルオキシ基で置換された C_{1-10} アラルキル基が好ましい。具体的には、シクロプロピルメチル基、 $-CH_2CH=CH(C_1H_5)CH_3$ 、ベンジル基、フェニルエチル基などが好ましい。 R^2 および R^3 としては、メチル基などの C_{1-10} アルキル基が好ましい。

【0025】化合物【1】が塩を形成する場合は、一般式

【化9】



（式中、 R 、 R^1 、 R^2 および X^- は前記と同意義を示す）で表わされる化合物が好ましい。

【0026】 R としては、式 $-OR''$ （式中、 R'' は水

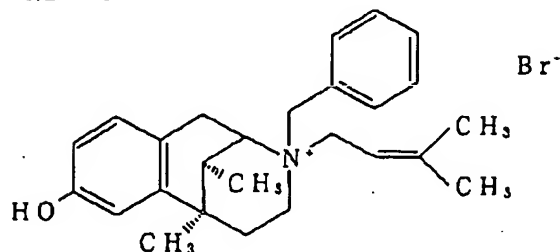
12

素原子、 C_{1-10} アルキル基または C_{1-10} アルコキシカルボニル基を示す）で表わされる基が好ましく、特に、水酸基が好適である。 R^1 および R^2 としては、一方が C_{1-10} アルケニル基（例えば、 $-CH_2CH=CH(C_1H_5)CH_3$ など）で、他方が水酸基または C_{1-10} アルコキシカルボニルオキシ基などで置換されていてもよい C_{1-10} アラルキル基（例えば、ベンジル基など）である場合などが好ましく、特に、一方が $-CH_2CH=CH(C_1H_5)CH_3$ で、他方がベンジル基である場合が好適である。 X^- としては、例えば、臭素イオン、ヨウ素イオンなどが好ましく、特に臭素イオンが好適である。

【0027】化合物【1】の好適な具体例として下記の化合物を挙げることができる。

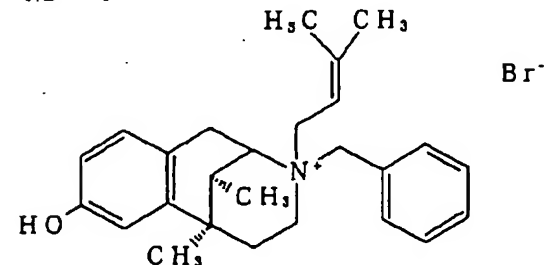
【化合物1】

【化10】



【0028】【化合物2】

【化11】



【0029】

【発明の実施の態様】化合物【1】またはその塩は、公知の方法、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により製造することができる。例えば、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー（J. Med. Chem.）12:694-696(1969)、ジャーナル・オブ・ヘテロサイクリック・ケミストリー（J. Heterocycl. Chem.）9:1057-1059(1972)、ジャーナル・オブ・ヘテロサイクリック・ケミストリー（J. Heterocycl. Chem.）9:1065-1069(1972)などに記載されている方法あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。化合物【1】が不斉炭素を有する場合には立体異性体が存在しうが、それらの各立体異性体およびそれらの混合物も本発明に含まれる。また、その置換基に不斉炭素を有する場合にも立体異性体が存在しうが、それらの各立体異性体およびそれらの混合物も本発明に含まれる。

【0030】化合物【1】またはその塩は、ケモカイン

受容体拮抗作用を有しており、ケモカイン受容体拮抗剤として有用である。ここでケモカインとしては、CXCケモカイン (α ケモカイン) とCCケモカイン (β ケモカイン) がある。CXCケモカインは、好中球、好塩基球、線維芽細胞などに作用してこれらの細胞を遊走させ、例えば、IL-8 (インターロイキン8)、GRO (growth-related cytokine)、NAP-2 (neutrophil activating peptide 2) などがある。CCケモカインは、単球、リンパ球、好酸球、好塩基球、肥満細胞に作用してこれらの細胞を遊走させ、また脱顆粒や種々の炎症性メディエーターの放出などの作用を有しており、例えば、RANTES (regulated on activation, normal T expressed and secreted)、MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 α)、MIP-1 β 、MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1)、MCP-2、MCP-3、I-309などがある。化合物〔I〕またはその塩は、特に、RANTES、MIP-1 α 、MCP-3などのCCケモカインとケモカイン受容体との結合を効率よく阻害することができる。

【0031】このように化合物〔I〕またはその塩は、ケモカインとケモカイン受容体との結合を阻害するケモカイン受容体拮抗作用を有しているため、ケモカイン受容体拮抗剤として、例えば、前記したCCケモカインの作用を抑制することができる。例えば、種々のウイルス性疾患あるいは感染性疾患 (例えば、急性ウイルス性脳炎、急性バクテリア性髄膜炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肺炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘-帯状疱疹ウイルス感染症、エイズ感染症、インフルエンザ感染症、侵襲性ブドウ球菌感染症、結核など)、腫瘍 (例えば、膀胱ガン、乳ガン、子宮けいガン、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、大腸ガン、多発性骨髄腫、悪性骨髄腫、前立腺ガン、肺ガン、胃ガン、ホジキン病など)、アレルギー性疾患 (例えば、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎など)、炎症性疾患 (例えば、動脈硬化症、心臓移植後に発症する動脈硬化、(慢性) 関節リウマチ、腎炎など)、糖尿病性疾患 (例えば、糖尿病、糖尿病性腎症、糖尿病性合併症、糖尿病性網膜症、糖尿病性網膜炎、糖尿病性細小血管症など)、中枢性疾患 (例えば、アルツハイマー病、てんかん、発熱、疼痛、痴呆など)、高脂血症、高コレステロール血症、透析による血小板減少症、脊髄損傷、骨粗鬆症、潰瘍性大腸炎、消化性潰瘍、敗血症 (ショック)、肺・心臓における再灌流障害、不安定狭心症、一過性脳虚血発作、心弁膜症、臓器移植後拒絶反応、血管形成術後再狭窄、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、腎不全、子宮内膜症、肺繊維症、成人呼吸逼迫症候群などの治療・予防に有用であり、特にアレルギー性疾患、炎症性疾患の治療・予防に有用である。

【0032】化合物〔I〕またはその塩は、安全で毒性

が低いので、そのままあるいは自公知の方法に従って、薬理的に許容される担体を混合した医薬組成物、例えば錠剤 (糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、散剤、顆粒剤、カプセル剤、(ソフトカプセルを含む)、液剤、注射剤、坐剤、徐放剤などとして、経口的または非経口的 (例、局所、直腸、静脈投与等) に、ヒトまたは哺乳動物 (例えば、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、トリ、ラット、マウス、モルモットなど) に投与することができる。本発明の拮抗剤における化合物〔I〕またはその塩の含有量は、製剤全体の約0.1~100重量%である。該投与量は、投与対象、投与ルート、疾患などによっても異なるが、例えば、(慢性) 関節リウマチ治療剤として、成人 (体重60kgとして) に対し、経口剤として1日あたり有効成分として約0.1~500mg、好ましくは約1~100mg、さらに好ましくは約5~100mgであって、1日1回~数回に分けて投与することができる。本発明の拮抗剤の製造に用いられてもよい薬理的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質があげられ、例えば、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤; 液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などが用いられる。また、必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、吸着剤、湿潤剤などの添加物を用いることもできる。

【0033】賦形剤としては、例えば、乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、コーンスターチ、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸などが用いられる。滑沢剤としては、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカなどが用いられる。結合剤としては、例えば、結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、デンプン、ショ糖、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどが用いられる。崩壊剤としては、例えば、デンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、L-ヒドロキシプロピルセルロースなどが用いられる。溶剤としては、例えば、注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油などが用いられる。溶解補助剤としては、例えば、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムなどが用いられる。

【0034】懸濁化剤としては、例えば、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウ

ム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤；例えば、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシアセチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子などが用いられる。等張化剤としては、例えば、ブドウ糖、D-ソルビトール、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトールなどが用いられる。緩衝剤としては、例えば、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが用いられる。無痛化剤としては、例えば、ベンジルアルコールなどが用いられる。防腐剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが用いられる。抗酸化剤としては、例えば、亜硫酸塩、アスコルビン酸などが用いられる。

【 0 0 3 5 】

【実施例】本発明は、さらに以下の参考例および実施例によって詳しく説明されるが、これらの例によって本発明が何ら限定されるものではない。本明細書で用いられる略号は当該分野で慣用的に使用されるものであり、以下にその例を示す。

DNA : デオキシリボ核酸
cDNA : 相補的デオキシリボ核酸
RNA : リボ核酸
mRNA : メッセンジャーリボ核酸
BSA : ウシ血清アルブミン
CHO : チャイニーズハムスター卵巣
DMEM : ダルベッコ変法イーグル培地
FBS : ウシ胎児血清
SDS : ドデシル硫酸ナトリウム
PBS : リン酸緩衝生理食塩水

【 0 0 3 6 】 後述の参考例 1 で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109/pCCR は、平成 7 年 1 2 月 1 9 日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-5342 として寄託されており、また平成 7 年 1 2 月 2 8 日から財団法人発酵研究所 (IFO) に IFO 15909 として寄託されている。後述の参考例 2 で得られた CHO/CCR は、平成 7 年 1 2 月 1 9 日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-5343 として寄託されており、また平成 7 年 1 2 月 2 8 日から財団法人発酵研究所 (IFO) に IFO 50459 として寄託されている。

【 0 0 3 7 】

【参考例 1】ヒト MIP-1 α /RANTES 受容体発現ベクターの構築

PCR (polymerase chain reaction) 法によりヒト膜 cDNA ライブラリー (U-937 cells activated by PM

A, クロンテック・ラボラトリーズ社, Palo Alto, CA, USA) から、Neote らの報告 (セル (Cell) 72:415-425 (1993)) の Kpn I (392) ~ Hinc II (886) に相当する約 500 bp の DNA 断片を得た。これをプローブとして、ヒト MIP-1 α /RANTES 受容体 cDNA を得て、 λ gt11 の EcoR I 部位にクローン化した。翻訳領域の全塩基配列を決定し、Neote らの報告と完全に一致していることを確認した。なお、塩基配列の決定は全て蛍光 DNA シークエンサー (Model 373A, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) により行った。クローン化されたヒト MIP-1 α /RANTES 受容体 cDNA を、以下のようにして動物細胞発現用ベクターである pAKKO-111H の Sal I および Nhe I 部位に導入し、プラスミド pCCR を構築した。まず、上記の λ gt11 を EcoR I で処理することにより 2 つの断片を得た。これらを pUC19 (宝酒造、京都) の EcoR I 部位に導入し、プラスミド pCCR-1 とプラスミド pCCR-2 を得た。次に、5' 側と 3' 側の非翻訳領域に切断部位がある制限酵素 *Tth* I I I と *Bst* XI を用いて pCCR-1 と pCCR-2 の一方の EcoR I 部位を削除した。非翻訳領域の EcoR I 部位を削除したこれら 2 つのプラスミドを Sal I -EcoR I および *Xba* I -EcoR I で消化することにより、2 つの DNA 断片を得た。これらを pAKKO-111H の Sal I と Nhe I 部位に導入してヒト MIP-1 α /RANTES 受容体発現プラスミド pCCR を得た。該プラスミド pCCR を大腸菌 *Escherichia coli* JM109 に導入し、形質転換体 *Escherichia coli* JM109/pCCR を得た。

【 0 0 3 8 】

【参考例 2】ヒト MIP-1 α /RANTES 受容体発現 CHO 細胞株の樹立

ヒト MIP-1 α /RANTES 受容体発現プラスミド pCCR を、CellPfect transfection kit (ファルマシア・バイオテック社, Uppsala, Sweden) を用いてリン酸カルシウム法により、以下のように CHO (dhfr⁻) 細胞へ導入した。CHO (dhfr⁻) 細胞を直径 10 cm のシャーレで核酸 (+) の非選択培地 (MEM- α with RNA and DNA (ギブコ BRL, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA) / 10% 透析 FBS (ギブコ BRL)) にて 24 時間培養した。この CHO (dhfr⁻) 細胞に pCCR DNA とリン酸カルシウムの共沈懸濁物と滴下し、6 時間培養した。非選択培地で 2 回洗浄し非選択培地を加えて 2 日間さらに培養し、核酸 (-) の選択培地で 4 倍に拡大して培養を継続した。3 ~ 4 日ごとに新しい選択培地と交換しながら培養を続け、出現したコロニー (dhfr⁺ 形質転換した細胞) を得た。これらの細胞に対する ¹²⁵I-RANTES (デュボン社, Wilmington, DE, USA) の結合量を調べ、結合量の大きいクローンを限界希釈法により再クローン化し、ヒト MIP-1 α /RANTES 受容体を高発現している細胞株 CHO

(CCR)を得た。

[0039]

【参考例3】結合アッセイによるヒトMIP-1 α /RANTES受容体発現の確認

96ウェルマイクロプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) に 5×10^4 / $100 \mu\text{l}$ / well の実施例2で記述した CHO/CCR細胞またはベクタープラスミドpAKK0-111HをトランスフェクトしたCHO細胞 (mock transfectants) をまき24時間培養した。培地を除き、DMEM/0.5%BSAで希釈した5nMの ^{125}I -RANTESあるいは ^{125}I -MIP-1 α を $50 \mu\text{l}$ / well 加え、室温で30分間インキュベートした。その後、 $200 \mu\text{l}$ / well のPBSで2回洗浄し、 $100 \mu\text{l}$ / well の0.1 NNaOH/1% SDSを加えて細胞に結合したリガンドを溶出した。結合量の測定は γ -カウンター (Cobra II, Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA) で行った。その結果、CHO (CCR) 細胞に対して、 ^{125}I -RANTESおよび ^{125}I -MIP-1 α は結合よく結合した。これに対して、mock transfectantsに対する結合量はいずれも低値であった。

[0040]

【参考例4】種々のCCケモカインに対するヒトMIP-1 α /RANTES受容体発現CHO細胞 (CHO (CCR) 細胞) の遊走

96ウェルマイクロケモタキシスチャンパー (NeuroProbe, Inc., Cabin John, MD, USA) を用いて参考例2で記述したCHO (CCR) 細胞の遊走アッセイを行った。ポアサイズ $5 \mu\text{m}$ のポリカーボネートフレームフィルター (NeuroProbe) を、PBSで希釈した $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のウシフィブロネクチン溶液に室温で10分間浸漬したのち風乾することにより前処理を施した。下室にDMEM/0.5% BSAに溶解した $37 \mu\text{l}$ の種々の濃度のCCケモカイン (RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, MCP-3 (いずれもPepro Tech)) を添加し、上室に 1×10^4 cells/ml のCHO (CCR) 細胞を $200 \mu\text{l}$ 添加して、 37°C で4時間インキュベートした。フィルター下面に遊走したCHO (CCR) 細胞をDiff-Quick (国際試薬, 神戸) で固定染色し、プレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) で 595nm の吸光度を測定した。その結果、CHO (CCR) 細胞はRANTES, MIP-1 α およびMCP-3に対して濃度依存的に遊走することがわかった。しかしながら、MIP-1 β やMCP-1に対しては遊走しなかった。

[0041]

【参考例5】CHO (CCR) 細胞による細胞内 Ca^{2+} アッセイ

参考例2のCHO (CCR) 細胞をmodified Gey's buffer (MGB) (5mM KCl, 147mM NaCl, 0.22mM KH_2PO_4 , 1.1mM Na_2HPO_4 , 5.5mM glucose, 0.3mM MgSO_4 , 1mM MgCl_2 , 10mM HEPES, pH7.4) で2回洗浄したのち、 5×10^4 / ml になるようにMGBに懸濁した。蛍光指示薬であるfura-PE

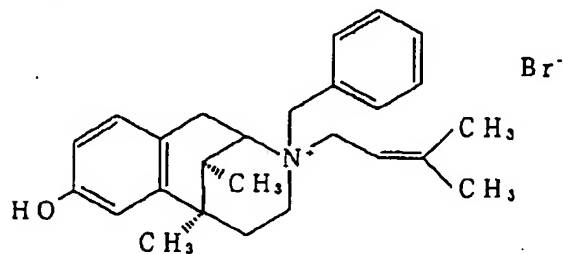
3/AM (Teflabs, Austin, TX, USA) 終濃度 $2 \mu\text{M}$ になるように添加して室温で30分間放置することにより細胞内に取り込ませた。 1mM CaCl_2 を含むMGBで2回洗浄したのち、 5×10^4 / ml になるように 1mM CaCl_2 を含むMGBに懸濁した。細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定はF-2000分光蛍光光度計 (日立製作所, 東京) で行った。CHO (CCR) 細胞を 100nM RANTESで刺激することにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過性の上昇が観察された。この上昇はmock transfectantsではみられなかった。CHO (CCR) 細胞は、RANTESのみならず、MIP-1 α にも応答して細胞内 Ca^{2+} 濃度が一過性に上昇したが、MIP-1 β に対する応答性は低く、MCP-1にはほとんど応答しなかった。

[0042]

【参考例6】ジャーナル・オブ・ヘテロサイクリック・ケミストリー (J. Heterocycle. Chem.) 9:1057-1059 (1972) のEXPERIMENT (20) に従って、化合物1および化合物2が製造される。

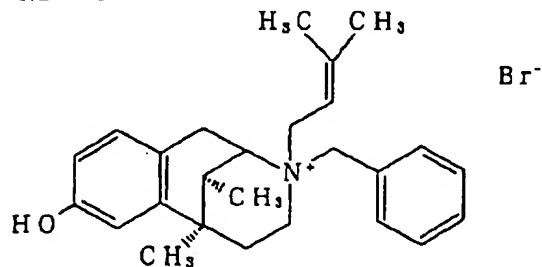
[0043] [化合物1]

20 [化12]



[0044] [化合物2]

30 [化13]



[0045]

40 【実施例1】化合物1 (100mg)、ラクトース 165mg 、コーンスターチ 25mg 、ポリビニールアルコール 4mg およびステアリン酸マグネシウム 1mg を用いて、常法により錠剤を製造する。

【実施例2】化合物1 (5g) を注射用蒸留水に溶かし、全量 100ml とした。この液を $0.22 \mu\text{m}$ のメンブランフィルター (住友電気工業 (株) 又はザルトリウス社製) を用いて無菌濾過し、洗浄滅菌済バイアルに 2ml ずつ分注し、これを常法により凍結乾燥し、 100mg / バイアルの凍結乾燥注射剤を製造する。

50 【実施例3】化合物2 (100mg)、ラクトース 16

5 mg, コーンスターチ 25 mg, ポリビニールアルコール 4 mg およびステアリン酸マグネシウム 1 mg を用いて、常法により錠剤を製造する。

【実施例 4】化合物 2 (5 g) を注射用蒸留水に溶かし、全量 100 ml とした。この液を 0.22 μ m のメンブランフィルター(住友電気工業(株)又はザルトリウス社製)を用いて無菌濾過し、洗浄滅菌済バイアルに 2 ml ずつ分注し、これを常法により凍結乾燥し、100 mg/バイアルの凍結乾燥注射剤を製造する。

【0046】

【実施例 5】ヒト MIP-1 α /RANTES 受容体発現 CHO 細胞 (CHO (CCR) 細胞) を用いた ¹²⁵I-RANTES 結合阻害活性の測定

96 ウェルマイクロプレート (CulturPlate, Packard) に参考例 2 に記述した CHO (CCR) 細胞を 5 x 10⁴/100 μ l/well でまき 24 時間培養した。培地を除いた後、35 μ l/well の DMEM/0.5% BSA、ついで DMEM/0.5% BSA で希釈した化合物 1 および 2 を 5 μ l/well、さらに 10 μ l/well の ¹²⁵I-RANTES (終濃度 100~200 pM) を順次添加し、室温で 30~40 分間インキュベートした。その後 200 μ l/well の PBS で 2 回洗浄し、25 μ l/well のエタノールを添加して攪拌した。さらに、200 μ l/well のシンチレーター (Micro Scint-20, Packard) を添加して攪拌したのち、細胞に結合した ¹²⁵I-RANTES の放射活性を TopCount (Packard) で測定した。被験化合物を添加しない場合の結合量を 100%、ベクタープラスミド pAKK0-111H をトランスフェクトした CHO 細胞 (mock transfectants) への結合を 0% とし、¹²⁵I-RANTES の結合を 50% 阻害する濃度 (IC₅₀ 値) を求め、その結果を下記の表 1 に示した。上記の方法で測定した結果、化合物 1 および 2 が CHO (CCR) 細胞に対する ¹²⁵I-RANTES の結合を阻害することを見出した。化合物 1 および 2 は、CHO (CCR) 細胞に対する ¹²⁵I-MIP-1 α の結合をも阻害した (表 1)。

【0047】

【実施例 6】ヒト MIP-1 α /RANTES 受容体発現 CHO 細胞 (CHO (CCR) 細胞) の遊走アッセイにおける化合物 1 の阻害活性

参考例 4 に述べた方法により、RANTES に対する CHO (CCR) 細胞の遊走アッセイにおけるベンズアゾシン化合物の阻害活性を調べた。下室には DMEM/0.5% BSA に溶解した 37 μ l の 40 nM の RANTES あるいは

は MCP-3 を添加し、上室にまず DMEM/0.5% BSA で希釈した種々の濃度の化合物 1 を 100 μ l を添加し、ついで 2 x 10⁴ cells/ml の CHO (CCR) 細胞を 100 μ l 添加して、37℃で 4 時間インキュベートした。フィルター下面に遊走した CHO (CCR) 細胞を Diff-Quick で固定染色し、プレートリーダーで 595 nm の吸光度を測定した。いずれの測定も 2 度行った。下室に 40 nM の濃度の RANTES を添加し上室に化合物 1 を添加しない場合の吸光度を 100%、下室に DMEM/0.5% BSA のみを添加し上室に化合物 1 を添加しない場合の吸光度を 0% とし、CHO (CCR) 細胞の遊走を 50% 阻害する濃度 (IC₅₀ 値) を求めた。表 1 に示したように、化合物 1 の IC₅₀ 値は、RANTES による遊走に対して 0.5 μ M、MIP-1 α による遊走に対して 3 μ M、MCP-3 による遊走に対して 0.3 μ M であった。

【0048】

【実施例 7】ヒト MIP-1 α /RANTES 受容体発現 CHO 細胞 (CHO (CCR) 細胞) による細胞内 Ca²⁺ アッセイにおける化合物 1 の阻害活性

参考例 5 に述べた方法により、細胞内 Ca²⁺ アッセイにおける化合物 1 の阻害活性を調べた。すなわち、CHO (CCR) 細胞懸濁液に種々の濃度の化合物 1 を添加し、その 150 秒後に 10 nM の RANTES を添加して、RANTES の誘因する細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇に対するベンズアゾシン化合物の作用を調べた。その結果、細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇を 50% 抑える化合物 1 の濃度 (IC₅₀ 値) は 0.4 μ M (表 1) であることがわかった。また、化合物 1 の添加のみでは、細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇の一過性の上昇は認められなかった。さらに、化合物 1 は 10 nM の MIP-1 α による細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇をも抑制し、その IC₅₀ 値は 0.4 μ M であった (表 1)

この結果は、実施例 5 および実施例 6 の結果とともに、化合物 1 はヒト MIP-1 α /RANTES 受容体に対してアゴニストとして作用せず、アンタゴニストとして作用することを示す。また、化合物 1 はヒト MIP-1 α /RANTES 受容体のリガンドであるならば RANTES、MIP-1 α あるいは MCP-3 など種類を問わずその活性を阻害することを示す。

【0049】

【表 1】

| | IC ₅₀ 値 (μ M) | | | | | | |
|-------|-------------------------------|----------------|--------|----------------|-------|---------------------------|----------------|
| | 結合アッセイ | | 遊走アッセイ | | | 細胞内 Ca ²⁺ アッセイ | |
| | RANTES | MIP-1 α | RANTES | MIP-1 α | MCP-3 | RANTES | MIP-1 α |
| 化合物 1 | 0.2 | 0.6 | 0.5 | 3 | 0.3 | 0.4 | 0.4 |
| 化合物 2 | 6 | 20 | | | | | |

【 0 0 5 0 】

【発明の効果】本発明のケモカイン受容体拮抗作用を有する化合物〔I〕またはその塩を含有するケカイン受容体拮抗剤は、ウイルス性疾患あるいは感染性疾患、腫瘍、アレルギー性疾患、炎症性疾患、糖尿病性疾患、中枢性疾患、高脂血症、高コレステロール血症、透析による血小板減少症、脊髄損傷、骨粗鬆症、潰瘍性大腸炎、

消化性潰瘍、敗血症（ショック）、肺・心臓における再灌流障害、不安定狭心症、一過性脳虚血発作、心弁膜症、臓器移植後拒絶反応、血管形成術後再狭窄、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、腎不全、子宮内膜症、肺繊維症、成人呼吸逼迫症候群などの治療・予防剤として有用である。

フロントページの続き

| (51) Int. Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|----------------------------|------|--------|------------|--------|
| | ABC | | | ABC |
| | ABE | | | ABE |
| | ABF | | | ABF |
| | ABJ | | | ABJ |
| | ABN | | | ABN |
| | ABR | | | ABR |
| | ABY | | | ABY |
| | ACA | | | ACA |
| | ACD | | | ACD |
| | ACJ | | | ACJ |
| | ACL | | | ACL |
| | ACV | | | ACV |
| | ADN | | | ADN |
| | ADP | | | ADP |
| | ADU | | | ADU |
| | ADX | | | ADX |
| | ADY | | | ADY |
| // C07D221/26 | | | C07D221/26 | |